

Efficiency of *Chlamydia Pneumoniae* Culture in the Upper Airway Epithelial Cell Lines: AMC-HN-4, AMC-HN-7, and AMC-HN-8

Dae-Hee Choi¹, Seung-Joon Lee¹ and Jun Yeon Won²

¹Departments of Internal Medicine, ²Otolaryngology, School of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

상부 호흡기 상피세포주 AMC-HN-4, AMC-HN-7, AMC-HN-8에서
*Chlamydia Pneumoniae*의 배양 효율

최대희¹ · 이승준¹ · 원준연²

강원대학교 의학전문대학원 내과학교실, ¹ 이비인후과학교실²

Background and Objectives *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) is a well-known pathogen of upper and lower respiratory tract infection. For a more efficient and practical cell culture system, we studied the growth of two clinical isolates of *C. pneumoniae* in selected cell lines derived from the human respiratory tract.

Materials and Method HeLa 229, HEp-2, which are well-known cell lines for the culture of *C. pneumoniae*, and AMC-HN-4, AMC-HN-7, AMC-HN-8, which are the newly developed cell lines in Korea were examined. Strains of *C. pneumoniae* used in this study were TW-183 and LKK-1 (the first Korean strain). Chlamydia was inoculated on each confluent cell line and incubated for 48 hrs. After staining with anti-Chlamydial lipopolysaccharide monoclonal antibody, we compared the efficiency of the *C. pneumoniae* infection on each cell line by counting the inclusion bodies.

Results In culturing *C. pneumoniae* LKK-1, AMC-HN-4 cells consistently yielded higher inclusion body counts than HeLa 229 cells did, whereas inclusion body counts by AMC-HN-7 cells was low. AMC-HN-7, AMC-HN-8 cells yielded lower inclusion body counts than HEp-2 cells. In culturing *C. pneumoniae* TW-183, AMC-HN-4, AMC-HN-7, and AMC-HN-8 cells did not yield lower inclusion body counts than HeLa 229 cells did. AMC-HN-7 cells yielded lower inclusion body counts than HEp-2 cells.

Conclusion The newly established upper airway epithelial cell lines, AMC-HN-4 and AMC-HN-8, had similar culture efficiency as HeLa 229 and HEp-2 cells for Chlamydial infection; therefore, these two cell lines could be used for the future studies of *C. pneumoniae*.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2013;56:90-4

Key Words Cell culture · *Chlamydia pneumoniae* · Epithelium.

Received November 15, 2012
Revised January 17, 2013
Accepted January 31, 2013
Address for correspondence
Jun Yeon Won, MD
Department of Otolaryngology,
School of Medicine,
Kangwon National University,
1 Gangwondaehak-gil,
Chuncheon 200-701, Korea
Tel +82-33-258-2311
Fax +82-33-258-2296
E-mail wonjy@kangwon.ac.kr

서 론

Chlamydia pneumoniae (*C. pneumoniae*)는 *Chlamydia* 속 (屬)에 속한 균종 중에서 세 번째로 동정된 균주로 1986년 처음으로 동정되었고,¹⁾ 부비동염, 인두염, 중이염, 폐렴, 기관지염 등 여러 호흡기 질환의 원인으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 이외에도 *C.*

*pneumoniae*의 만성 감염이 심혈관 질환이나 만성 호흡기 질환과 관련성이 있다는 보고가 제기된 바 있다.⁵⁾

*C. pneumoniae*는 연구 및 진단에 필수적인 임상검체로부터의 균의 분리 및 배양은 매우 어려운 것으로 알려져 있는데,⁶⁾ 국내에서는 Choi 등⁷⁾에 의해 474개 이상의 객담 검체에 대한 분리 시도가 실패로 돌아갔다는 보고가 있다. 2002년 본 연구자들

은 *C. pneumoniae*를 국내 최초로 분리 배양하는 데 성공하여 *C. pneumoniae* LKK-1로 명명한 바 있다.⁸⁾

세포내 증식을 하는 *C. pneumoniae*는 현재까지 자궁경부세포, 내피세포, 대식세포, 평활근 등에서 배양이 성공적임이 보고되고 있는데, 전통적으로 HeLa 229, HEp-2 세포주가 배양 효율이 높아서 흔히 사용된다.⁹⁾ 그러나 HeLa 229 세포주와 HEp-2 세포주는 자궁경부암으로부터 유래하였으므로, 실제 호흡기 감염을 일으키는 *C. pneumoniae*의 세포내 작용 기전에 대한 연구시 제한점을 갖는다. 현재까지 가장 흔한 감염소인 상부 호흡기로부터 유래되어 효율적으로 배양에 성공한 세포주가 아직 보고되고 있지 않으므로 실제로 인체에서 균의 감염이 일어나는 상부 호흡기 상피세포주를 찾는 것이 이 균의 연구에 중요할 것으로 생각된다.

1997년 Kim 등¹⁰⁾은 후두암 및 설암에서 기원한 호흡기 상피세포주를 개발, 보고하였는데, 본 연구의 목적은 이들 세 개의 호흡기 상피세포주가 얼마나 *C. pneumoniae*의 배양에 효율적인가를 알아보고자 함이다.

재료 및 방법

세포주

전통적으로 Chlamydia 배양에 사용되는 HeLa 229 [(American Type Culture collection) ATCC # CCL-2.1], HEp-2 세포주(ATCC # CCL-23)와 최근 개발된 AMC-HN-4, AMC-HN-7, AMC-HN-8 세 개의 호흡기 상피세포주를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3~4일간 키운 후 계대배양하여 사용하였다. 배지는 Eagle's Minimal Essential Media(MEM, GibcoBRL, Cat# 41500-067)에 10% fetal bovine serum(FBS)를 첨가하였고, 2일마다 교체하였다.

*C. pneumoniae*를 접종(inoculation)하기 위해서 멸균된 cover glass를 넣은 24 well plate에 2.5×10⁵ cells/mL를 각 well마다 1 mL씩 넣고 37°C에서 24시간 배양하여 단일층을 형성한 것을 확인하여 균주를 접종할 준비를 하였다.

Chlamydia pneumoniae

국내 균주인 *C. pneumoniae* LKK-1⁸⁾과 ATCC 표준 균주인 *C. pneumoniae* TW-183을 이용하였다. 균주는 기존에 보고된 바와 같이 HEp-2 세포주에서 증폭하여, 30% urografin을 이용한 분리를 하였고, Sucrose-Phosphate-Glutamate(sucrose 75 g; KH₂PO₄ 0.52 g; Na₂HPO₄ 1.22 g; glutamic acid 0.72 g; H₂O 1 L; pH 7.4~7.6) buffer로 희석하여 -70°C에서 보관하였다.¹¹⁾

균 접종 및 배양

균주를 well당, 10⁴ Inclusion Forming Unit를 넣고, 900×g에서 1시간 동안 실온에서 원침한 뒤에, cycloheximide(1 ug/mL)가 첨가된 10% FBS-MEM 배지를 넣고 35°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다.¹²⁾

면역형광염색

48시간 배양한 well에서 배지를 흡인한 후, PBS 1 mL로 1회 세척하고 100% 에탄올을 well당 1 mL씩 넣고 15분간 고정시켰다. Cover glass를 꺼내어 말린 후 슬라이드에 *Chlamydia*에 대한 Fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody(*Chlamydia* FA, Denka Seiken, Tokyo, Japan) 20 μL씩 옮겨놓고, cover glass를 덮었다. 37°C에서 30분간 보존한 뒤, PBS와 3차 증류수로 세척후 cover glass를 말리고 50% glycerol PBS를 슬라이드에 옮겨놓고 cover glass를 덮고 형광현미경으로 관찰하였다.

봉입체(Inclusion body) 수 계산

면역형광현미경으로 400배로 관찰하면서 20시야에서 봉입체(inclusion body)의 수를 세어 계산하였다. 실험은 각 세포주 당 6번씩 시행되었다.

통계

통계학적 분석은 dBSTAT software version 4.0(dBSTAT, Inc., Seoul, Korea)을 이용한 Analysis of Variance 분석을 시행하여 세포주에 따른 *C. pneumoniae* 균주 배양의 효율성을 비교하였다. 사후 검정으로 Scheffe 검정을 하여 각 세포주에 따른 감염력을 비교하였다. 유의 수준은 5%로 하였다.

결과

형광현미경 결과

HeLa 229, HEp-2 세포주와 AMC-HN-4, AMC-HN-7, AMC-HN-8 세포주에 LKK-1과 TW-183 균주를 이용하여 배양하였고, 면역형광염색을 하고 형광현미경으로 확인한 결과, 다양한 크기 및 형태의 봉입체를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

세포주에 따른 *Chlamydia pneumoniae* LKK-1의 봉입체수

C. pneumoniae LKK-1 균주로 감염시킨 세포주에서 봉입체 수를 측정하였고, 6번의 실험을 반복하여 평균을 구하였다(Fig. 2). HeLa 229는 26831±10452, HEp-2는 39578±7272, AMC-HN-4는 47859±7604, AMC-HN-7은 9191±3336, AMC-

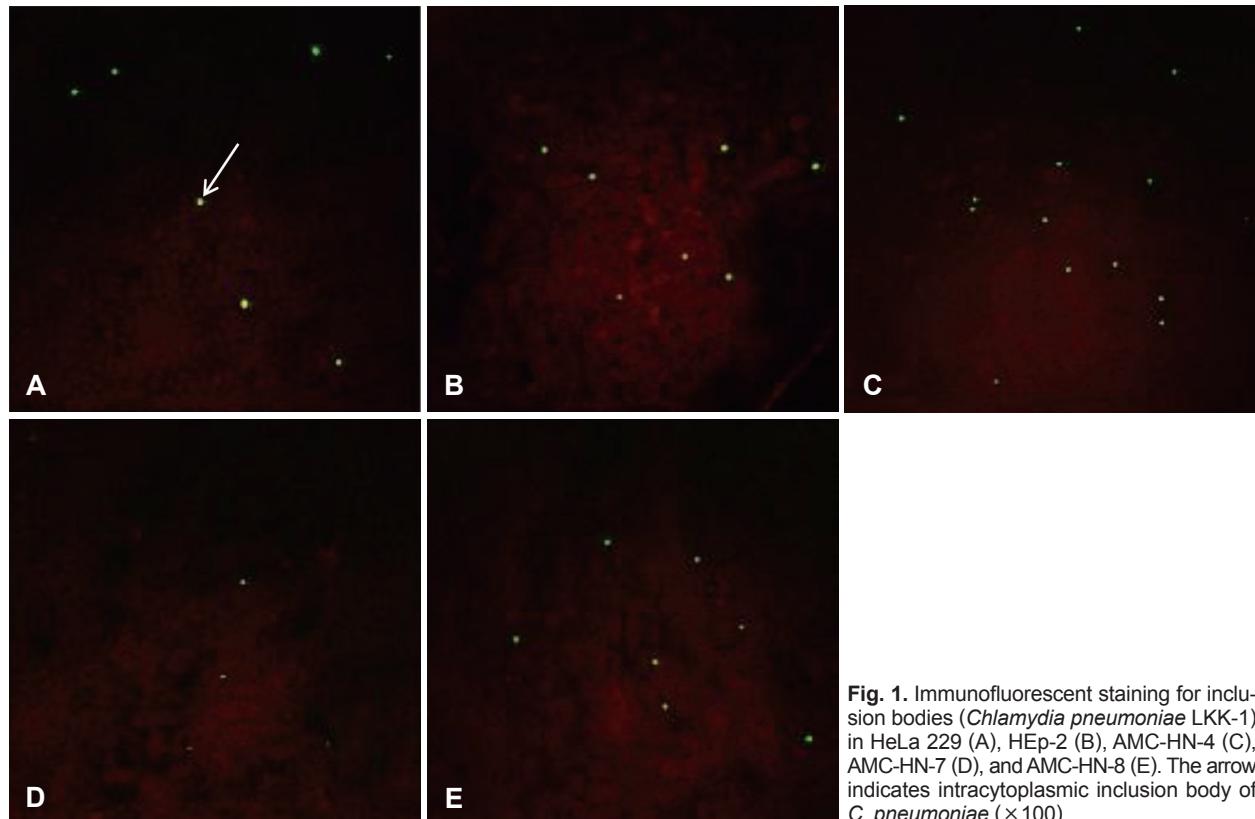


Fig. 1. Immunofluorescent staining for inclusion bodies (*Chlamydia pneumoniae* LKK-1) in HeLa 229 (A), HEp-2 (B), AMC-HN-4 (C), AMC-HN-7 (D), and AMC-HN-8 (E). The arrow indicates intracytoplasmic inclusion body of *C. pneumoniae* ($\times 100$).

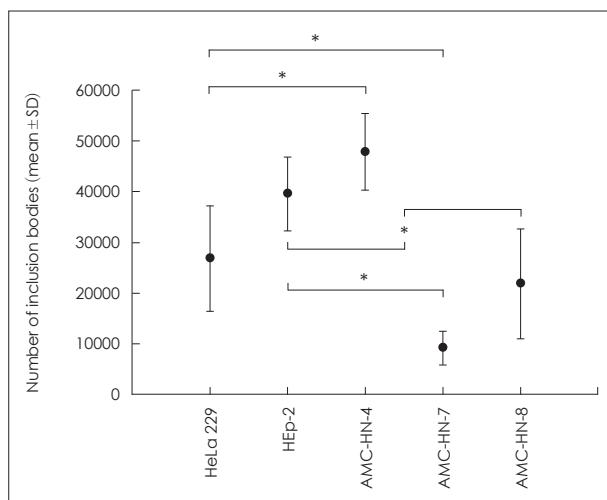


Fig. 2. Results of inclusion body counting (*Chlamydia pneumoniae* LKK-1) in HeLa 229, HEp-2, AMC-HN-4, AMC-HN-7, and AMC-HN-8 (* $p<0.05$). SD: standard deviation.

HN-8는 21777 ± 10827 이었다. 배양의 효율성은 HeLa 229 세포주에 비해 HEp-2 세포주와 AMC-HN-8 세포주는 차이가 없고, AMC-HN-4 세포주는 유의하게 높고($p<0.05$), AMC-HN-7 세포주는 유의하게 낮았다($p<0.05$). HEp-2 세포주에 대해서 AMC-HN-4 세포주는 차이가 없고($p>0.05$), AMC-HN-7, AMC-HN-8 세포주는 유의하게 낮았다($p<0.05$).

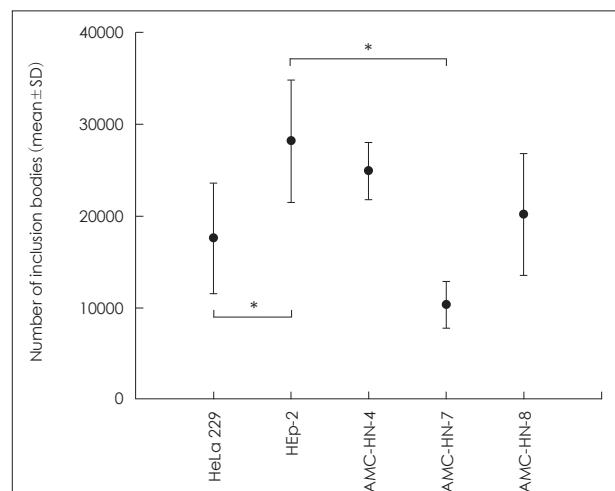


Fig. 3. Results of inclusion body counting (*Chlamydia pneumoniae* TW-183) in HeLa 229, HEp-2, AMC-HN-4, AMC-HN-7, and AMC-HN-8 (* $p<0.05$). SD: standard deviation.

세포주에 따른 *Chlamydia pneumoniae* TW-183의 봉입체수

C. pneumoniae TW-183 균주로 감염시킨 세포주에서 봉입체수를 측정하였고, 6번의 실험을 반복하여 평균을 구하였다 (Fig. 3). HeLa 229는 17554 ± 6033 , HEp-2는 28152 ± 6700 , AMC-HN-4는 24923 ± 3101 , AMC-HN-7은 10267 ± 2565 , AMC-HN-8은 20120 ± 6656 이었다. 배양의 효율성은 HeLa

229 세포주에 비해 HEp-2 세포주가 유의하게 높고($p<0.05$), AMC-HN-4, AMC-HN-7, AMC-HN-8 세포주는 차이가 없었다($p>0.05$). HEp-2 세포주에 대해서는 AMC-HN-7 세포주만 유의하게 낮았다($p<0.05$).

고 칠

*C. pneumoniae*는 상하기도 감염의 주요 원인균으로서, 지역 사회 획득폐렴 원인균의 10~20%를 차지하는 것으로 알려져 있고,²⁾ 국내의 경우 혈청학적 진단 기준을 적용했을 때 지역사회 획득폐렴 환자의 약 12%에서 원인균으로 알려져 있다.³⁾ *C. pneumoniae* 항체보유는 학동기 아동의 30% 미만에서 발견되고,¹³⁾ 20세 이하의 50%, 60~70세의 70~80%에서 발견되는 것으로 보고되고 있어 유병률이 높음을 알 수 있다.⁵⁾

이비인후과적인 영역에서 보면 급성 중이염 환자의 8%에서 *C. pneumoniae*가 원인균으로 생각된다는 보고가 있으며,¹⁴⁾ 인후염, 중이염, 부비동염의 5~10%에서 *C. pneumoniae*가 원인인 것으로 보고되고 있다.^{4,6)} 일본의 보고를 보면 소아 급성 호흡기 감염환자 411명 중 58명(14.1%)에서 *C. pneumoniae*가 동정되었고, 이 중 폐렴이 34.5%, 기관지염이 41.4%, 상기도 호흡기 감염이 24.1%였다.¹⁵⁾

고전적으로 *C. pneumoniae* 배양시 흔히 자궁경부암 세포주인 HeLa 229, HEp-2 세포주가 배양 효율이 좋아서 사용되어 왔는데, *Chlamydia* 균주 중에 *C. pneumoniae*는 비교적 최근에 동정이 되었고, 이전에는 성병균인 *Chlamydia trachomatis*에 관한 연구가 많이 시행되었기 때문이다. 질병 모델 연구를 위해서 *C. pneumoniae*는 종래에는 후두상피세포 기원으로 알려진 HEp-2 세포가 많이 쓰였으나,⁹⁾ 이 역시 미국세포주은행인 ATCC에서는 자궁경부암 세포의 변종으로 생각된다고 언급하고 있다.¹⁶⁾ 세포주마다 생물학적 현상의 차이가 있으므로 상하부 호흡기 감염을 일으키는 *C. pneumoniae*의 연구에서는 호흡기 상피세포에서 유래한 세포주의 확립이 절실하다고 할 수 있다. 기존의 연구에서는 Wong 등⁹⁾이 후두암 기원의 HR6 세포주가 HeLa 229, HEp-2 세포주와 비교해서 *C. pneumoniae* 배양효율이 좋지 않았음을 보고하였다. 본 연구에서는 이와 같은 목적을 위해 상부 호흡기 상피세포주로 국내에서 최근 개발된 설암에서 기원한 AMC-HN-4와 후두암에서 기원한 AMC-HN-7, AMC-HN-8 세포주에서의 *C. pneumoniae* 배양 효율성을 고전적으로 사용되는 HeLa 229, HEp-2 세포주에서의 배양 효율성과 비교하여 향후 연구에서의 이용 가능성을 알아보기자 하였다.

최근 국내에서 개발된 세 가지 세포주를 이용한 본 실험의 결과 기준에 배양을 위해 이용하던 HEp-2 세포주와 비슷한 감

염효율을 보인 AMC-HN-4와 AMC-HN-8 세포주는 앞으로 실제 임상과 비슷한 생물학적 조건에서 실험이 가능할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 HEp-2 세포주의 감염 효율이 HeLa 229 세포주보다 높게 측정되어 이전 연구와 일치하는 결과를 보였다.⁹⁾

기관지 호흡상피세포주도 생물학적으로 실제와 가까운 세포라는 장점이 있지만 감염효율이 떨어지는 문제가 있어왔다. 최근 기관지 호흡상피세포인 BEAS-2B 세포는 HEp-2 세포에 비해 *C. pneumoniae*의 감염이 20분의 1 정도 낮은 것으로 알려지고 있다.¹⁷⁾ 따라서 본 연구자들이 이번 연구를 통해 기존의 세포주에 비교하여 효율성이 낮지 않은 기도 상피세포 유래 세포주를 처음으로 제시한 것으로 생각된다.

본 실험을 포함하여 *C. pneumoniae*의 감염을 위해서 원심 분리하는 것이 감염을 증가시키는 것으로 알려지고 있다.¹²⁾ 이 과정이 일부 cytokine의 분비를 증가시킨다는 보고가 있어,¹⁸⁾ cytokine에 관한 연구에서는 원심분리과정에 대해 신중하게 고려해야 할 것이다. 그러나, 본 연구는 감염효율에 관한 비교 연구로 대조군과 실험군을 같은 조건으로 원심분리하여 감염시켰으므로 이 과정에 의한 오류의 가능성은 배제되었을 것으로 생각된다.

C. pneumoniae 배양시 세포주를 polyethylene glycol, trypsin, Diethylaminoethyl(DEAE)-dextran 등으로 전처치하면서 효과적이라는 보고가 있으나,^{9,19)} 다른 연구자들은 DEAE-dextran 전처치가 오히려 봉입체의 크기를 감소시키고 이전에 보고되었던 배양시 이점이 없다는 보고를 하였다.²⁰⁾ 본 연구에서는 이러한 전처치 과정을 생략함으로써 배양 과정을 단순화시키고자 하였다.

결론적으로 최근 개발된 상부 호흡기 상피세포주에 대한 실험결과 AMC-HN-4 세포주는 기준에 배양을 위해 이용하던 HeLa 229 세포주, HEp-2 세포주와 비슷하거나 높은 감염의 효율을 보였고, AMC-HN-8 세포주는 기준에 배양을 위해 이용하던 HeLa 229 세포주와 비슷하며 HEp-2 세포주에 비해서는 *C. pneumoniae* 균주의 종류에 따라 비슷하거나 낮은 감염 효율을 보였다. 이에 본 저자들은 AMC-HN-4, AMC-HN-8 세포주는 앞으로 *C. pneumoniae*의 여러 연구에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

Acknowledgments

The authors appreciate the generous gift of AMC-HN-4, AMC-HN-7 and AMC-HN-8 cells provided by Dr. Sang Yoon Kim of the Ulsan University, Seoul, Korea.

REFERENCES

- Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J*

- Med 1986;315(3):161-8.
- 2) Woodhead M. Community acquired pneumonia in elderly people. Addition of erythromycin is not currently justified. *BMJ* 1998;317(7171):1524.
- 3) Lee SJ, Lee MG, Jeon MJ, Jung KS, Lee HK, Kishimoto T. Atypical pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia in Korea. *Jpn J Infect Dis* 2002;55(5):157-9.
- 4) Blasi F, Cosentini R, Tarsia P. Chlamydia pneumoniae respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13(2):161-4.
- 5) Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. Chlamydophila pneumoniae. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(1):29-35.
- 6) Peeling RW. Chlamydia pneumoniae infections: applications of laboratory methods. In: Allegra L, Blasi F, editors. *Chlamydia pneumoniae: the lung and the heart*. 1st ed. Milano: Springer;1999. p.33-42.
- 7) Choi TY, Kim DA, Choi MY. Detection of Chlamydia pneumoniae by 'Touchdown' PCR. *Korean J Clin Pathol* 1998;18(4):570-6.
- 8) Lee SJ, Nam EC, Won J, Park WS, Kim WJ, Han SS, et al. Characterization of the first Korean isolate of a Chlamydia pneumoniae strain. *Jpn J Infect Dis* 2003;56(2):62-4.
- 9) Wong KH, Skelton SK, Chan YK. Efficient culture of Chlamydia pneumoniae with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* 1992;30(7):1625-30.
- 10) Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE. Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol* 1997;117(5):775-84.
- 11) Li D, Vaglenov A, Kim T, Wang C, Gao D, Kaltenboeck B. High-yield culture and purification of Chlamydiaceae bacteria. *J Microbiol Methods* 2005;61(1):17-24.
- 12) Kumamoto Y, Matsumoto A, Nagayama A, Soejima R, Hirai K, Hashizume S, et al. Method for in vitro determination of chlamydial susceptibility to antimicrobial agents. *Chemotherapy* 1992;40(3):308-14.
- 13) Dal Molin G, Longo B, Not T, Poli A, Campello C. A population based seroepidemiological survey of Chlamydia pneumoniae infections in schoolchildren. *J Clin Pathol* 2005;58(6):617-20.
- 14) Block SL, Hammerschlag MR, Hedrick J, Tyler R, Smith A, Roblin P, et al. Chlamydia pneumoniae in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(9):858-62.
- 15) Ikezawa S. Prevalence of Chlamydia pneumoniae in acute respiratory tract infection and detection of anti-Chlamydia pneumoniae-specific IgE in Japanese children with reactive airway disease. *Kurume Med J* 2001;48(2):165-70.
- 16) Chen TR. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 1988;48(1):19-24.
- 17) Jahn HU, Krüll M, Wuppermann FN, Klucken AC, Rousseau S, Seybold J, et al. Infection and activation of airway epithelial cells by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis* 2000;182(6):1678-87.
- 18) Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Tondella ML, Talkington DF. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Chlamydia pneumoniae infection. *Infect Immun* 2003;71(2):614-20.
- 19) Kazuyama Y, Lee SM, Amamiya K, Taguchi F. A novel method for isolation of Chlamydia pneumoniae by treatment with trypsin or EDTA. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1624-6.
- 20) Pruckler JM, Masse N, Stevens VA, Gang L, Yang Y, Zell ER, et al. Optimizing culture of Chlamydia pneumoniae by using multiple centrifugations. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3399-401.